BIOLOGISCHE EFFEKTE VON GUANIDINOVERBINDUNGEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Angelos Hadjianghelu
aus Athen / Griechenland

1980

BIOLOGISCHE EFFEKTE VON GUANIDINOVERBINDUNGEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Angelos Hadjianghelu
aus Athen / Griechenland

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	8. Oktober 1980
Dekan:	Prof. Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. G. Weitzel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Guglielmi

Die vorliegende Arbeit wurde im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. G.Weitzel von Dezember 1977 bis Juni 1980 durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel für die Überlassung des Themas, die effektive Beratung bei der Durchführung der Versuche und für die großzügige Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. W. Sarrazin sowie allen Mitarbeitern unseres Arbeiskreises danke ich für ihre großzügige Hilfe bei der Durchführung der Arbeit. Insbesondere danke ich Frau Dr. A.-M. Fretzdorff, Frau Dr. B. Pfeiffer, Herrn Prof. Dr. H. Guglielmi und Herrn Dipl. Biochem. W. Halfter für Synthese und Überlassung der geprüften Substanzreihen. Ausserdem danke ich Herrn Dipl. Biochem. W. Eichler für Messungen am Insulinrezeptor.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0062

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
MATERIALIEN	3
I. Apparate und Hilfsmittel	3
II.Substanzen und Chemikalien	3
III.Lösungen	4
MITOCHONDRIALE ATMUNG	7
I. Methoden	8
II. Ergebnisse	10
III. Diskussion	15
GLUKOSEPERMEATION	18
I. Methoden	20
II. Ergebnisse	25
III. Diskussion	35
cAMP-TEST	38
I. Methoden	39
II. Ergebnisse	42
III. Diskussion	47
ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DER GUANIDINO-VERBINDUNGEN	48
ZUSAMMENFASSUNG	51
LITERATURVERZEICHNIS	52

ABKÜRZUNGEN

cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
PPO	2,5 Diphenyloxazol
POPOP	2,2-p-Phenylen-bis-(4-methyl-5-phenyloxazol)

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Seit WATANABE 1918 (1) erstmals von der blutzuckersenkenden Eigenschaft des Guanidin berichtete, hat die Erforschung der biologischen Effekte von Guanidin und Guanidinderivaten großes Interesse auf sich gezogen. Dieses Interesse wuchs als HOLLUNGER 1955 (2) feststellte, daß Guanidin und Guanidinderivate effektive Hemmer der mitochondrialen Atmung sind.

Trotz zahlreicher Untersuchungen konnte ihr Wirkungsmechanismus und insbesondere der Zusammenhang zwischen blutzuckersenkender und atmungshemmender Eigenschaft noch nicht geklärt werden.

Jedoch wird heute angenommen, daß die durch Guanidinoverbindungen hervorgerufene Blutzuckersenkung das Resultat einer doppelten Wirkung ist. In der Leber wird die Glukosefreisetzung herabgesetzt, während in der Peripherie (Muskelgewebe) die Glukoseverwertung gesteigert wird (3). Diese Annahme stützt sich insbesondere auf den Befund, daß viele Guanidinoverbindungen auch die Glukoseaufnahme in das Rattendiaphragma steigern (3,4). Eine Steigerung der Glukoseaufnahme im Muskelgewebe bei gleichzeitiger Hemmung der mitochondrialen Atmung läßt auch auf eine Herabsetzung der Glukoneogenese schließen, denn für die Desaminierung von Aminosäuren und Umkehrung des EMDEN-MEYERHOF-Schemas ist eine aktive Atmung erforderlich.

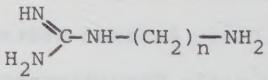
Da die Unklarheit über ihren Wirkungsmechanismus

unter anderem darauf zurückzuführen ist, daß noch nicht alle biologischen Effekte der Guanidinoverbindungen untersucht worden sind und aus den verschiedenen bis heute untersuchten Substanzen keine Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzustellen sind, war Aufgabe dieser Arbeit:

a) durch Untersuchung weiterer Stoffwechseleffekte der Guanidinoverbindungen und

b) durch Aufstellen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen

einen Beitrag zur Erforschung der biologischen Effekte und Klärung des Wirkungsmechanismus der Guanidinoverbindungen zu liefern. Dazu wurde die Wirkung 3 homologer Reihen von Guanidinoverbindungen auf die Atmung von Lebermitochondrien, sowie auf die Glukosepermeation und den cAMP-Spiegel von Adipocyten untersucht. Untersucht wurden folgende Reihen mit einer C-Kettenlänge von C_4 bis C_{11}

1) ω-Guanidino-säure-äthylester
2) ω-Guanidino-säure-dimethylamide
3) Homoagmatine 

MATERIALIEN

I. Apparate und Hilfsmittel

Umlaufthermostat	COLORA K-3125
Sauerstoffelektrode	YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS
Zentrifuge	BECKMAN Microfuge B
Schüttelthermostat	GFL BACHOFER
Szintillationsmessgerät	PACKARD 2450
Filtrierapparatur	DILUMATIC Fa. BRAUN,MELSUNGEN
Membranfilter	SCHLEICHER UND SCHÜLL BA 85

II. Substanzen und Chemikalien

Rinderalbumin: SIGMA, München. BSA-fraktion V powder

Kollagenase: SIGMA, München. Typ I

Insulin: Farbwerke HOECHST. Rinderinsulin
2x krist. 27 IE / mg

2-Desoxy-(^{14}C)-glukose: NEN, D 6072 Dreichenhain

Methyl-D-glukose, 3-O-(methyl-^{14}C): NEN, D 6072 Dreichenhain

Glukose, L-(1-^{14}C): NEN, D 6072 Dreichenhain

Spermidin · 3 HCl: SERVA, Heidlberg

1,6 Diaminohexan: MERCK, Darmstadt

1,10 Diaminodekan: EGA-CHEMIE, D 7924 Steinheim/Albuch

1,6 Tetramethyldiaminohexan: EGA-CHEMIE

Adenosin-5-diphosphat: BOEHRINGER, Mannheim

Adrenalin (L-Epinephrin): SIGMA, München

cAMP Test-Kombination: BOEHRINGER, Mannheim.
cAMP Radioisotopen-Verdünnugstest
(Filtertechnik)

Die Reihen der ω-Guanidino-säure-äthylester und ω-Guanidino-säure-dimethylamide wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. H. Guglielmi und Frau Dr. A.-M. Fretzdorff überlassen. Für die Überlassung der von Herrn W. Halfter synthetisierten Reihe der Homoagmatine danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel.

Die sonst noch benötigten Chemikalien wurden von der Firma E. Merck, Darmstadt in den Reinheitsstufen pro analysi oder für biochemische Zwecke geliefert.

Versuchstiere : männl. Ratten. Stamm Sprague-Dawley
Versuchstierfarm Tuttlingen.

III. Lösungen

1. 10%-ige Albuminlösung

10g Albumin werden in 50 ml Aqua bidest unter Vermeidung von Schaumbildung (Denaturierung) gelöst und 2 Tage gegen mehrmals gewechseltes Aqua bidest dialysiert. Mit ca 1n NaOH wird der pH auf 7,4 eingestellt und die Lösung über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wird der pH, der um ca 3 Einheiten zurückgegangen ist, erneut auf 7,4 gebracht. Die Lösung wird dann mit Aqua bidest auf

100 ml aufgefüllt und in kleineren Portionen eingefroren.

2. Tris-Puffer I : zur Zellaufarbeitung

Zusammensetzung	5,1g NaCl
	1,94g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$
	2,4g Tris
	0,1g Glukose
	ad 500 ml Aqua bidest und auf
	pH 7,8 einstellen (conc. HCl)
Zum Gebrauch	5,0 ml Puffer I
	3,5 ml 10% Albumin
	1,5 ml Aqua bidest
	pH kontrollieren, eventuell
	nachstellen.

3. Tris-Puffer II : zur Inkubation

Zusammensetzung	3,5g NaCl
	1,94g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$
	2,4g Tris
	0,1g Glukose
	ad 500 ml Aqua bidest und auf
	pH 7,2 einstellen (conc. HCl)
Zum Gebrauch	5,0 ml Puffer II
	2,0 ml 10% Albumin
	3,0 ml Aqua bidest
	pH kontrollieren, eventuell
	nachstellen.

4. Toluol-Szintillator

100 mg POPOP

5 g PPO

in 1000 ml Toluol lösen.

5. Isolationsmedium: Zur Mitochondrienpräparation

0,21 M Mannit, 0,07 M Sucrose, 10 mM Tris/HCl pH 7,4

38,26g Mannit, 24g Sucrose, 1,21g Tris, 38mg EDTA-Na_2 2 H_2O in 900 ml Wasser lösen, mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen und mit Wasser auf 1 l auffüllen.

6. Basismedium: Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs

0,1 M NaCl, 6 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris/HCl pH 7,4

20 mM KPP pH 7,4

a) 4,56g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$ in 1000ml Wasser lösen

b) 1,36g KH_2PO_4 in 500 ml Wasser lösen

und b) so lange zu a) geben bis ein pH von 7,4 erreicht ist. In 900 ml davon nacheinander lösen:

5,84g NaCl, 1,22g $MgCl \cdot 6\ H_2O$, 1,21g Tris

dann mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen und mit dem oben bereiteten Puffer (KPP-Puffer) auf 100 ml auffüllen.

MITOCHONDRIALE ATMUNG

Untersuchungen der mitochondrialen Atmung bei normalen und alloxandiabetischen Tieren haben gezeigt, daß Insulin keinen Einfluss auf das P:O Verhältnis von normalen Mitochondrien hat. Durch Zugabe von Insulin kann jedoch ein niedriges P:O Verhältnis (alloxandiabetische Tiere) wieder aufs normale Verhältnis gehoben werden (5).

Von diesem Insulineffekt auf die mitochondriale Atmung, der noch nicht völlig geklärt ist, wird angenommen, daß er kein direkter Effekt ist, sondern über eine Änderung der Konzentration der freien Fettsäuren auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran wirkt (5).

Von Guanidin und Guanidinderivaten ist bekannt, daß sie effektive Hemmer der mitochondrialen Atmung sind (6,7). Trotz zahlreicher Untersuchungen ist ihr Wirkungsmechanismus bis heute nicht völlig geklärt. Es hat sich aber gezeigt, daß sie in dem Prozess der oxidativen Phosphorylierung eingreifen. Entweder binden sie sich an ein energiereiches Intermediärprodukt oder sie verhindern seine weitere Umsetzung (6,7).

Da von Guanidin und Guanidinderivaten ebenfalls bekannt ist, daß sie eine Senkung des Blutzuckers hervorrufen können (6), wird der Aufklärung der biologischen Effekte von Guanidin und Guanidinderivaten besondere Bedeutung beigemessen.

MITOCHONDRIALE ATMUNG

I. Methoden

a) Mitochondrienpräparation

Die Rattenlebermitochondrien wurden im wesentlichen nach der Methode von HOGEBOOM, SCHNEIDER und PALADE (39) präpariert.

Einer nüchternen,durch Nackenschlag getöteten und gut ausgebluteten Ratte wird schnell die Leber entnommen und in 50 ml eisgekühltes Isolationsmedium gelegt. Die Leber wird kleingeschnitten und in einem 2 ml Potter rasch gepottert (2 Durchgänge, Eiskühlung). Das Homogenat wird in ein Zentrifugenglas überführt und 5 min. bei 600xg zentrifugiert. Der Niederschlag N_1 wird verworfen und der Überstand $Ü_1$ bei 10.000xg 5 min. lang weiter zentrifugiert. Anschließend wird vorsichtig die auf dem Überstand $Ü_2$ schwimmende Fettschicht entfernt und der restliche Überstand $Ü_2$ verworfen. Die Mitochondrienfraktion (Niederschlag N_2) wird zweimal in dem urspünglichen Volumen mit Isolationsmedium gewaschen. Schließlich werden die gewaschenen Mitochondrien in insgesamt 3 ml Isolationsmedium in einem 2 ml Potter aufgenommen und vorsichtig von Hand gepottert bis eine einheitliche Suspension erhalten wird. Diese wird bei 0 ^{o}C aufbewahrt.

b) Messung des Sauerstoffverbrauchs

Die Atmung wurde mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode in einer Apparatur ähnlich der von HAGIHARA (40) beschriebenen verfolgt.

In das mit Basismedium gefüllte Reaktionsgefäß (Volumen 3 ml) werden zuerst 0,1 ml der Mitochondriensuspension zugegeben. Nach Erreichen eines konstanten,

leichten Sauerstoffverbrauchs werden 50 µl einer 1 M Na-Succinat Lösung bzw. einer je 0,5 M an Malat und Glutamat Lösung (State 4) und nach 2 min. 10 µl einer 60 mM ADP-Lösung (State 3) hinzugefügt. Bei einem R.Q von mindenstens 4-5 werden noch während State 3 die zu prüfenden Substanzen hinzugegeben und zwar jeweils 20 µl einer entsprechenden Substanzlösung, daß die Endkonzentration der Substanzen 0.1 - 1 mM beträgt. Schließlich werden nach 1 min. gegebenfalls 20 µl einer 2 mM DNP-Lösung hinzugefügt.

II. Ergebnisse

a) Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester

In Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen (4,5) zeigten alle ω-Guanidino-säure-äthylester eine deutliche Hemmung der mitochondrialen Atmung.

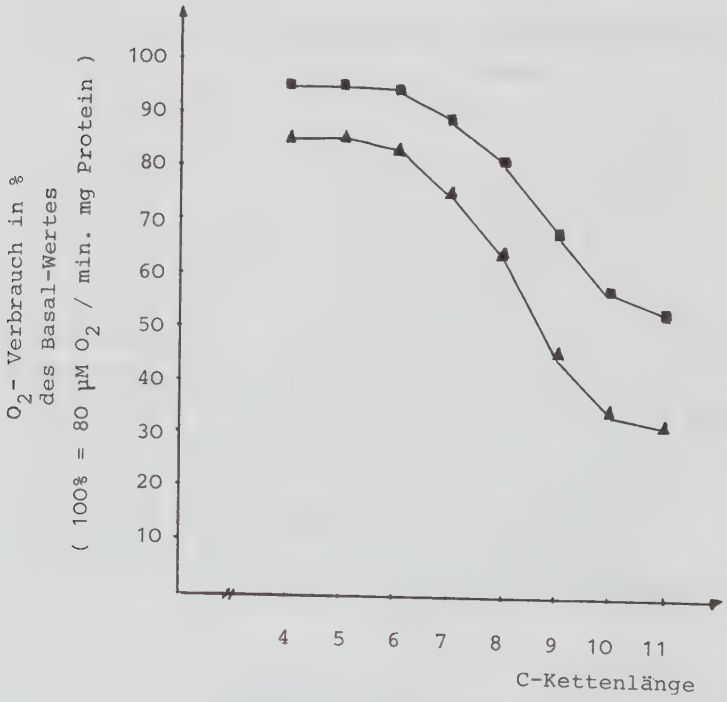


Abb. 1. Ergebnisse zum Einfluss der ω-Guanidino-säure-äthylester auf die mitochondriale Atmung. Mitochondrienkonzentration: 1 mg Protein / ml Reaktionsmedium. Substanzenkonzentration: 0,1 mM.

■ : Hemmung der mitochondrialen Atmung mit FAD-Substr.

▲ : Hemmung der mitochondrialen Atmung mit NAD-Substr.

Diese Hemmung, wie man aus Abb. 1 ersehen kann, war deutlich stärker bei gekoppelter Atmung mit NAD- als mit FAD-Substraten und nahm mit wachsender C-Kettenlänge zu. Ausserdem blieb sie aus, wenn die mitochondriale Atmung durch Entkoppler (z.B. DNP) entkoppelt wurde.

b) Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, zeigte die Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide ein ganz ähnliches Verhalten wie die der entsprechenden ω-Guanidino-säure-äthylester.

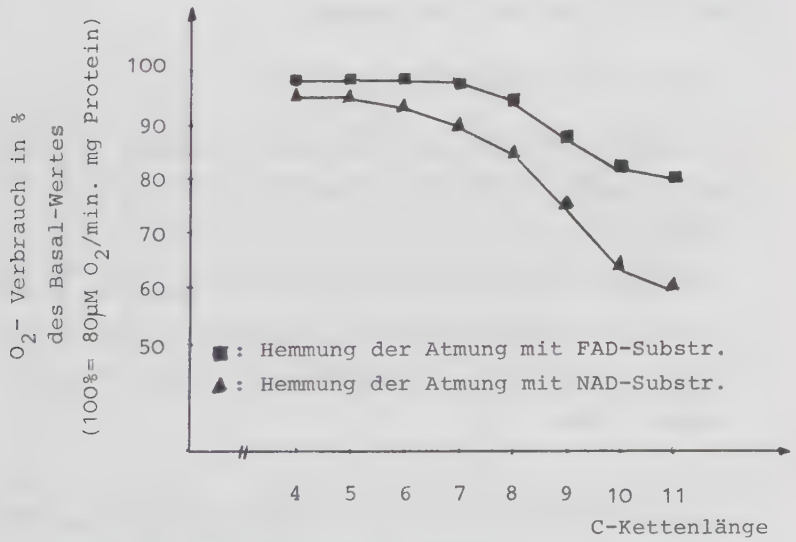


Abb. 2. Ergebnisse zum Einfluss der ω-Guanidino-säure-dimethylamide auf die mitochondriale Atmung. Mitochondrienkonzentration: 1 mg Protein / ml Reaktionsmedium. Substanzkonzentration: 0,1 mM.

Jedoch war die Hemmung der mitochondrialen Atmung sowohl mit NAD- als auch mit FAD-Substraten deutlich schwächer. Während bei gekoppelter Atmung mit NAD-Substraten die Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester schon bei 4-Guanidino-buttersäure-äthylester eine 15%-ige Hemmung zeigte und bei 11-Guanidino-undekansäure-äthylester ihr Maximum mit einer 65%-igen Hemmung erreichte, bewirkte die Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide erst bei 8-Guanidino-oktansäure-dimethylamid eine 15%-ige Hemmung und erreichte ihr Maximum bei 11-Guanidino-undekansäure-dimethylamid mit einer 40%-igen Hemmung.

c) Reihe der Homoagmatine

Die Reihe der Homoagmatine zeigte ebenfalls ein den beiden anderen Reihen ähnliches Verhalten mit einer noch schwächeren Hemmung der mitochondrialen Atmung.
Eine meßbare Hemmung zeigte sie bei gekoppelter Atmung mit NAD-Substraten erst ab C_9-Homoagmatin. Ihr Maximum erreichte sie bei C_{11}-Homoagmatin mit einer 30%-igen Hemmung (Abb. 3).

Die zusätzlich zu diesen 3 homologen Reihen geprüften Substanzen 1,6-Diaminohexan, 1,10-Diaminodekan, 1,6-Tetramethyldiaminohexan sowie Spermidin zeigten keine signifikante Hemmung weder bei Malat/Glutamat- noch bei Succinat-Oxidation.

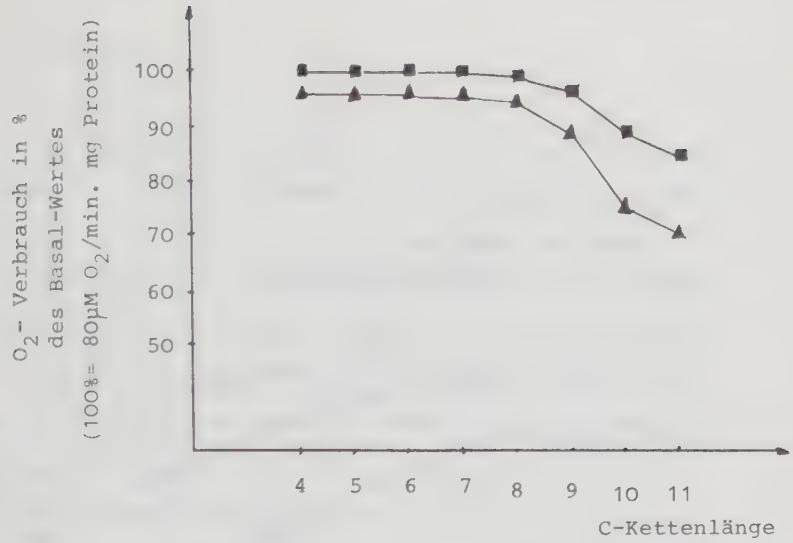


Abb. 3. Ergebnisse zum Einfluss der Homoagmatine auf die mitochondriale Atmung. Mitochondrienkonzentration: 1 mg Protein / ml Reaktionsmedium. Substanzkonzentration: 1 mM.

■ : Hemmung der mitochondrialen Atmung mit FAD-Substr.

▲ : Hemmung der mitochondrialen Atmung mit NAD-Substr.

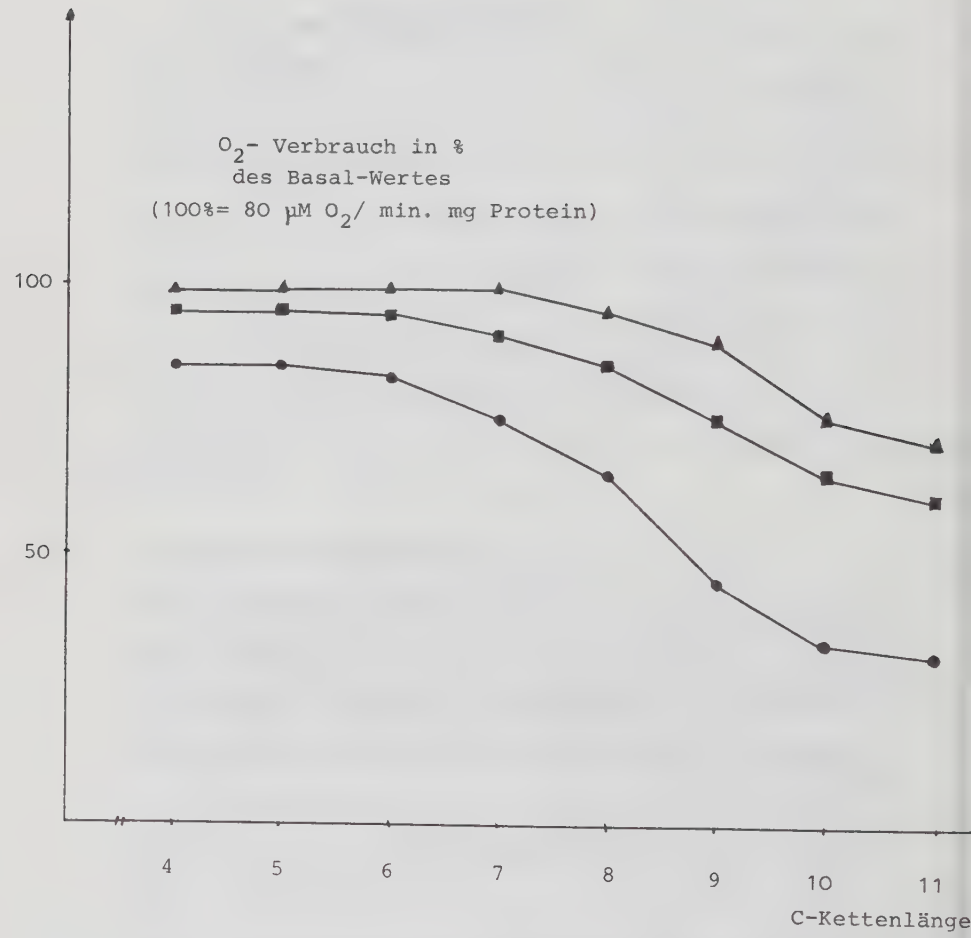


Abb. 4. Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss der drei homologen Reihen auf die mitochondriale Atmung (NAD-Substr.)

● : Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester

■ : Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide

▲ : Reihe der Homoagmatine

III. Diskussion

Es ist seit langem bekannt, daß Guanidin und Guanidinderivate effektive Hemmer der mitochondrialen Atmung sind (6,7).

Es hat sich gezeigt, daß sie in dem Prozess der oxidativen Phosphorylierung eingreifen. Entweder binden sie sich an ein energiereiches Intermediärprodukt oder sie verhindern seine weitere Verwertung (6,7). Die Hemmung wird durch Entkoppler (z.B. DNP) aufgehoben und es wird angenommen, daß sie an einer Stelle des Kopplungsmechanismus eingreifen, die vor der Angriffsstelle von Oligomycin liegt (6,8).

Doch trotz vieler Untersuchungen ist ihr Wirkungsmechanismus bis heute noch sehr umstritten. Schäfer, G. (9) und Schäfer, G. mit Rieges, E. (10) haben gezeigt, daß gewisse Guanidinderivate sich an mitochondriale Phospholipide binden und die Hypothese aufgestellt, daß die Membranänderung, die durch die Bindung hervorgerufen wird, verantwortlich für ihren Effekt auf die oxidative Phosphorylierung ist. Papa, S. , Tuena de Gomez-Puyou, M. und Gomez-Puyou, A. (11) fanden mit ihren Untersuchungen heraus, daß ausser der unspezifischen Bindung der Guanidinderivate an mitochondriale Phospholipide auch eine spezifische Bindung der Guanidinderivate an den ATPase-Komplex stattfindet und daß diese Bindung für den inhibitorischen Effekt ver-

antwortlich sein muß.

Ein Vergleich zwischen Struktur und Wirkung der hier untersuchten Substanzen führt zu folgenden Rückschlüssen:

1.) Die Guanidinogruppe muß für die hemmende Wirkung der Guanidinoverbindungen auf die mitochondriale Atmung eine wichtige Rolle spielen. Das zeigt sich besonders dadurch, daß einerseits alle Guanidinoverbindungen mit einer C_{10}-Kette (grosse Lipidlöslichkeit) eine deutliche Hemmung der mitochondrialen Atmung zeigten, anderseits bei 1,10-Diaminodekan (ebenfalls grosse Lipidlöslichkeit) keine signifikante Hemmung festgestellt werden konnte.

2.) Neben der Guanidogruppe ist die Lipidlöslichkeit von entscheidender Bedeutung. Das ergibt sich aus der Tatsache, daß das Ersetzen der Dimethylamid-gruppe durch die Äthylester-gruppe bzw. die Verlängerung der C-Kette nicht nur die Löslichkeit sondern auch die Wirkung beeinflußt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen somit die Hypothese von Papa, S. , Tuena de Gomez-Puyou, M. und Gomez-Puyou, A. (11), daß Guanidin und Guanidinderivate eine spezifische Bindung mit dem ATPase-Komplex eingehen

und daß diese Bindung für ihren inhibitorischen Effekt auf die mitochondriale Atmung verantwortlich sein muß.

GLUKOSEPERMEATION

Im Vordergrund der Stoffwechselwirkungen des Insulins stehen seine Wirkungen auf die Permeabilität der Plasmamembran. Insulin erhöht unter anderem in insulinempfindlichen Geweben die Glukose- und Aminosäureaufnahme in die Zellen.

Die Erforschung des Insulineffektes auf die Glukosepermeation kam trotz intensiver Bemühungen aus Mangel an geeigneten Methoden lange Zeit nicht voran. Die meisten Methoden zur Messung der Glukosepermeation betrafen in Wirklichkeit intrazelluläre Aspekte des Glukosemetabolismus z.B. Bildung von CO_2 bei der Glukoseoxidation (12, 13). Zudem erschwerte die Tatsache, daß die Glukosepermeation nicht nur durch äussere Faktoren (z.B. Insulin) sondern auch durch Änderung des intrazellulären Metabolismus der Zelle beeinflußt wird (14,15), die Wahl einer geeigneter Methode.

Erst in den letzten Jahren ist eine Methode entwickelt worden (16,17), die mit Hilfe von 2-Desoxy-D-glukose (18) bzw. 3-O-Methylglukose (19) eine schnelle und quantitative Messung der Initialgeschwindigkeit der Glukosepermeation ermöglicht.

Mit Hilfe dieser Methode konnte unter anderem gezeigt werden, daß nicht nur Insulin sondern auch andere Substanzen (z.B. Spermidin) die Glukoseoxidation und Glukosepermeation unabhängig voneinander beeinflußen können (20).

Doch trotz zahlreicher Untersuchungen ist der Mechanismus, durch welchen Insulin die Glukosepermeation stimmuliert, nicht geklärt. Während gewisse Insulineffekte mit einer Erniedrigung der cAMP-Konzentration eng verbunden sind (zb. antilipolytischer Effekt im Fettgewebe), gibt es keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Adenylat-Zyklase (bzw. Guanylat-Zyklase) und Glukosepermeation (21).

GLUKOSEPERMEATION

I. Methoden

a) Fettzellisolierung

Die Fettzellisolierung erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Rodbell, M. (16).

Es werden 120 - 140g schwere männliche Ratten verwendet. Nach dem Töten der Tiere werden sofort die Nebenhodenfettkörper herausgenommen und in ein vorbereitetes Plastikfläschchen gegeben, das ca. 4 mg Kollagenase in 3 ml Puffer I gelöst enthält. Man benötigt ca. 1g Fettgewebe. Das Fläschchen wird ca. 30 sec. mit Carbogen begast und schnell verschlossen. Das Fettgewebe wird anschliessend 60 min. bei 37 ^{o}C im Schüttelthermostat inkubiert. Die freigesetzten Zellen werden durch einen mit Aqua bidest gewaschenen Nylonstrumpf vom übrigen Gewebe abfiltriert und viermal mit vorgewärmten Puffer II zur Entfernung der Kollagenase gewaschen. Die Zellen werden hierzu 15 sec. bei geringer Tourenzahl zentrifugiert, das Medium abgesaugt, die Zellen mit neuen Puffer aufgewirbelt, zentrifugiert, usw. . Schließlich werden die Fettzellen mit Puffer II auf 30 ml verdünnt und unter schonendem Rühren sofort pipettiert.

b) Der Glukosepermeations-Test

1) Mit 2- Desoxy-D- glukose

Als Grundlage dazu diente die von Olefsky, J. (20) beschriebene Methode.

Die isolierten Fettzellen werden zunächst mit Insulin oder der zu prüfenden Substanz 45 min. bei 24 °C präinkubiert. Dazu werden 100µl der Zellsuspension in ein vorbereitetes Inkubationsröhrchen einpipettiert.

Ansatz : 100 µl Puffer
20 µl Insulin oder zu prüfende Substanz
20 µl Bicarbonat
100 µl Zellsuspension

Nach der Präinkubation werden 10 µl einer solchen 2-Desoxy-(^{14}C)-glukoselösung (spez. Aktiv. 2mCi/mM) zugegeben, daß die Endkonzentration im Ansatz 1mM ist. Anschliessend wird 3 min. bei 24 °C inkubiert. Die Inkubation wird durch Zugabe von 100 µl Dinonylphthalats und anschliessende Zentrifugation von 30 sec. in einer Eppendorf-Zentrifuge 3200 beendet. Danach werden die Röhrchen zunächst tief eingefroren (Trockeneis/Methanol Mischung) und anschließend durch die sich zwischen Zellen und Puffermedium befindliche Ölschicht von Dinonylphthalat durchgeschnitten. Die Zellschicht wird in ein Szintillatorgläschen gegeben das 10 ml Toluol-Szintillator

enthält. Nach 2h wird im Szintillationsmeßgerät 1 min. lang gezählt.

Versuchsanordnung: Nach der Isolierung der Fettzellen werden 4 Reihen (1 Insulinreihe und 3 mit der zu prüfenden Substanz) bestehend aus 5 Inkubationsröhrchen (1 Nullwert und eine Verdünnungsreihe aus 4 Konzentrationen) durch Zugabe von je 100 µl Zellsuspension pro Röhrchen mit jeweils 5 min. Zeitunterschied zur Präinkubation gebracht. Diese Zeitverschiebung beim Beginn der Präinkubation hat den Sinn, daß jede Reihe entsprechend 5 min. vor der nächsten mit der Präinkubation fertig ist und in diesen 5 min. inkubiert und anschließend zentrifugiert werden kann.

2) Mit 3-O-Methylglukose

Als Grundlage diente hier die von Gliemann, J. und Whitesell, R. (19) entwickelte Methode, die eine schnelle und quantitative Messung der Initialgeschwindigkeit der 3-O-Methylglukose erlaubt. Im Wesentlichen ist sie der oben beschriebenen Methode zur Messung der Glukosepermeation mit 2-Desoxyglukose sehr ähnlich. Sie unterscheidet sich eigentlich nur in der Länge der Inkubationszeit, die hier nicht länger als 10 sec. dauern darf. Da 3-O-Methylglukose eine hohe Permeationsgeschwindigkeit hat und die Wasserphase der

Fettzellen relativ sehr klein ist, kommt es schon innerhalb einiger Sekunden (ca. 20 sec.) zu einem Gleichgewicht zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Glukosekonzentration, d.h die Permeationsgeschwindigkeit bleibt nur für ca. 10 - 15 sec. linear. Die Inkubation wird nach 10 sec. durch Zugabe von Phloretin (0,3 mM) augenblicklich gestoppt.

3) Mit 2-Desoxyglukose in Abhängigkeit vom ATP-Spiegel

Zur Senkung ihres ATP-Spiegels werden die Fettzellen vor der Präinkubation mit Insulin bzw. der zu prüfenden Substanz 10 min. mit NaN_3 (10 mM) inkubiert (22). Da nun die Fettzellen nach der Senkung ihres ATP-Spiegels die 45 min. lange Präinkubation bei 24 °C sicher nicht ohne Vitalitätsabnahme überleben würden, wird die Präinkubationszeit auf 10 min. reduziert und dafür die Temperatur auf 37 °C erhöht (23). Die Durchführung des Versuchs entspricht bis auf die oben erwähnten Änderungen der Versuchsanordnung zur Messung der Glukosepermeation mit 2-Desoxyglukose.

4) Mit L-Glukose

Die Methode entspricht der für 2-Desoxy-D-glukose. 2-Desoxy-D-glukose wird durch dieselbe Konzentration

(1 mM) und spezifische Aktivität (2 mCi/mM) an L- Glukose ersezt.

II. Ergebnisse

1) Mit 2-Desoxy-D-glukose

a) Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester

Wie man aus Abb. 5 ersehen kann, zeigte die Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester eine deutliche mit wachsender C-Kettenlänge zunehmende Herabsetzung der Glukosepermeation.

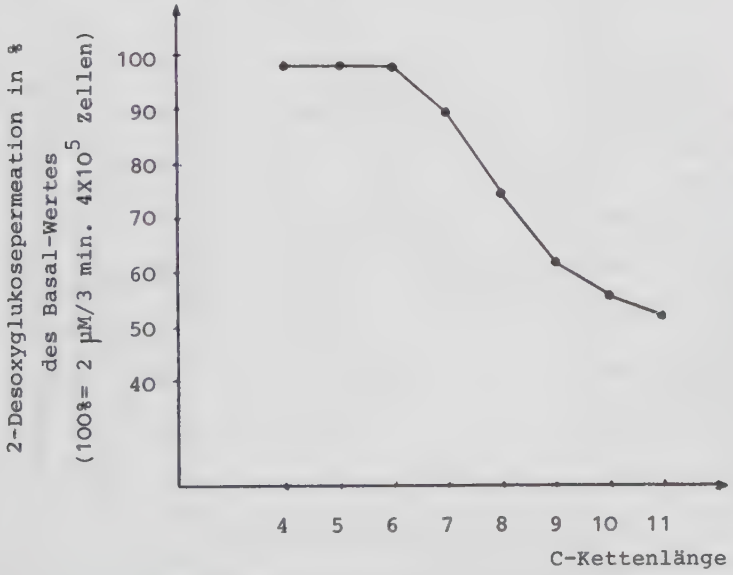


Abb. 5. Ergebnisse zum Einfluss der ω-Guanidino-säure-äthylester auf die Glukosepermeation in Fettzellen.

Beginnend bei 7-Guanidino-heptansäure-äthylester, mit einer 10%-ige Hemmung, erreichte sie bei 11-Guanidino-undekansäure-äthylerster eine 50%-ige Herabsetzung der Glukosepermeation in die Fettzellen.

b) Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide

Die Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide bewirkte, wie Abb. 6 zeigt, im Gegensatz zu den ω-Guanidino-säure-äthylester, eine deutliche Erhöhung der Glukosepermeation in die Fettzellen.

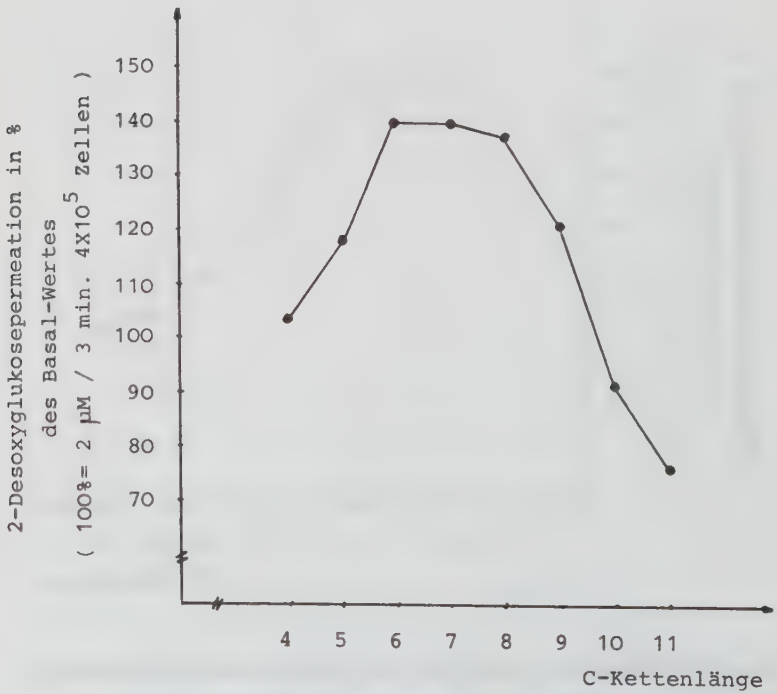


Abb. 6. Ergebnisse zum Einfluss der ω-Guanidino-säure-dimethylamide auf die Glukosepermeation in Fettzellen.

Von großer Bedeutung ist weiterhin die Wirkung der ω-Guanidino-säure-dimethylamide in Abhängigkeit von der C-Kettenlänge. Mit zunehmender C-Kette nimmt die Aktivität zuerst zu, erreicht bei C_6-C_8 ihr Maximum (ca. 140%-ige Aktivität) und nimmt dann ab, bis sich bei 11-Guanidino-undekan-säure-dimethylamid sogar eine leichte Hemmung zeigte (ca 75%-ige Aktivität).

c) Reihe der Homoagmatine

Die Reihe der Homoagmatine zeigte enfalls eine deutliche Erhöhung der Glukosepermeation in die Fettzellen.

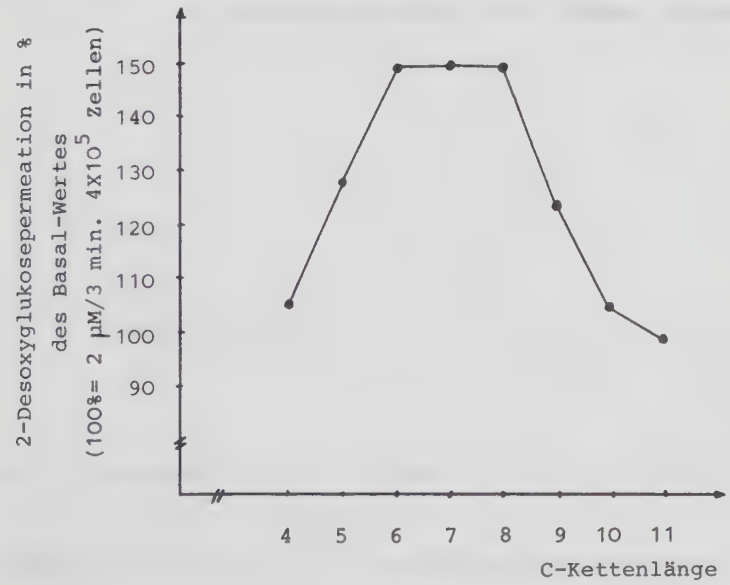


Abb. 7. Ergebnisse zum Einfluss der Homoagmatine auf die Glukosepermeation in Fettzellen.

Die Erhöhung war, wie im Abb. 7 zu sehen ist, leicht höher als die der ω-Guanidino-säure-dimethylamide. Während C_6-Homoagmatin, mit einer 150%-igen Erhöhung der Glukosepermeation eine leicht höhere Aktivität als das entsprechende 6-Guanidino-hexansäure-dimethylamid zeigte, bewirkte C_{11}-Homoagmatin im Gegensatz zu 11-Guanidino-undekansäure-dimethylamid eine kaum messbare Hemmung der Glukosepermeation.

Wichtig ist noch die Tatsache, daß 1,6-Tetramethyl-diaminohexan ebenfalls die Glukosepermeation erhöhte und dabei sogar eine etwas höhere Aktivität als C_6-Homoagmatin zeigte (ca. 160%-ige Aktivität).

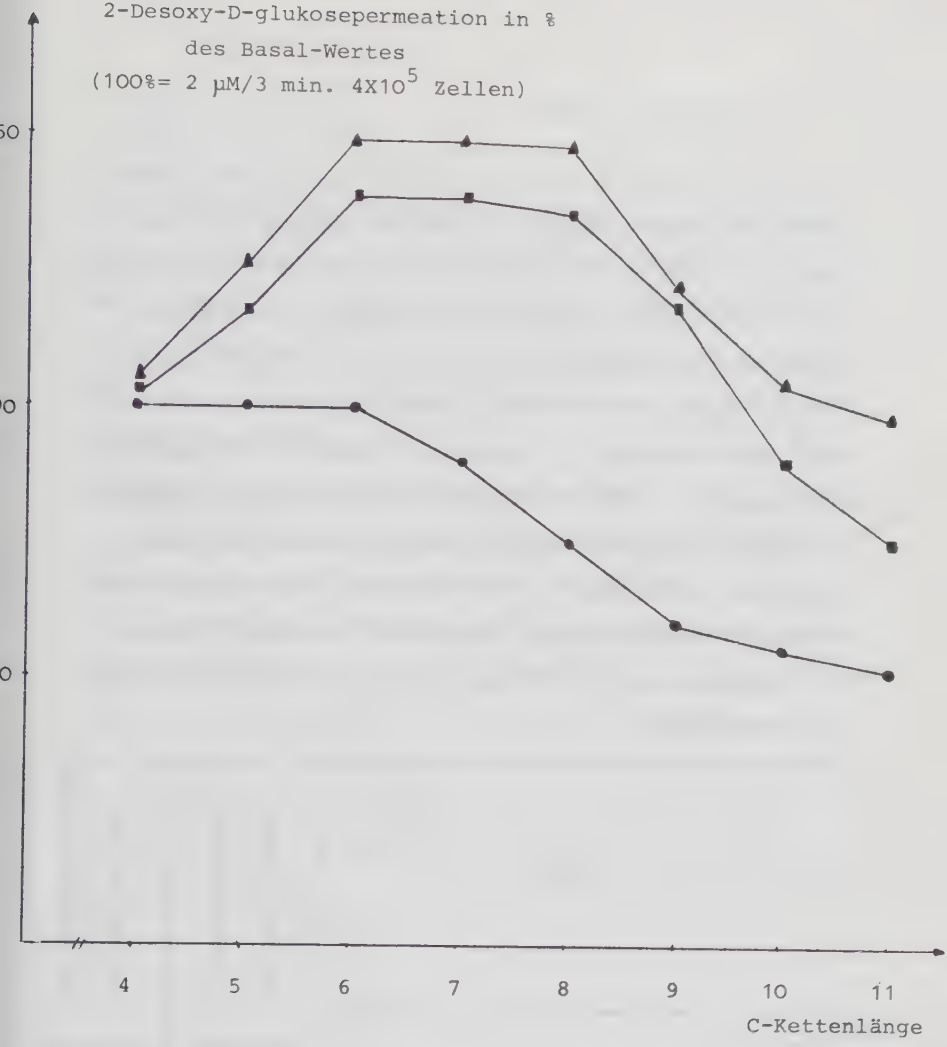


Abb. 8. Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Glukosepermeations-Test mit 2-Desoxy-D-glukose zum Einfluss der drei homologen Reihen auf die Glukosepermeation in Fettzellen.

● : Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester

■ : Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide

▲ : Reihe der Homoagmatine

2) Mit 3-O-Methylglukose

2-Desoxyglukose wird nach Eintritt in die Zelle phosphoryliert. Nicht dagegen 3-O-Methylglukose (23). Um nachzuprüfen, ob das phosphorylierte Produkt selbst die Glukosepermeation in Form einer Rückkopplung beeinflußt und somit Verfälschungen nach sich ziehe, wurde die Aktivität mancher Substanzen (Insulin, 6-Guanidino-hexansäure-dimethylamid, C_6-Homoagmatin sowie 1,6-Tetramethyldiaminohexan) zusätzlich mit 3-O-Methylglukose gemessen.

Doch bei Verwendung von 3-O-Methylglukose war keine signifikante Änderung in der Aktivität der untersuchten Substanzen festzustellen. Somit ist eine Beeinflussung der Glukosepermeation durch den phosphorylierten Zucker auszuschließen.

Substanzen	Stimmulierung mit 2-Desoxyglukose	Stimmulierung mit 3-O-Methylglukose
Insulin	3-fache	3-fache
C_6-Homoagmatin	1,5- "	1,5- "
6-Guanidino-hexansäure-dimethylamid	1,4- "	1,4- "
1,6-Tetramethyldiaminohexan	1,6- "	1,6- "

Tab. 1. Ergebnisse aus dem Glukosepermeations-Test mit 3-O-Methylglukose.

3) Mit L-Glukose

Der Einstrom von L-Glukose in die Zellen erfolgt durch einfache Diffusion und wird von Insulin nicht beeinflußt (23). Daher kann der Glukosepermeations-Test bei Verwendung von L-Glukose statt 2-Desoxyglukose einen wichtigen Hinweis auf die Frage geben, ob eine Substanz, die schon bei dem Glukosepermeations-Test mit 2-Desoxyglukose eine Aktivität zeigte, insulinspezifisch wirkt.

Aus Tab. 5 geht hervor: bei Verwendung von L-Glukose konnte im Falle von Insulin keine signifikante Erhöhung des Einstroms von L-Glukose festgestellt werden, die geprüften Substanzen hingegen, C_6-Homoagmatin, 6-Guanidinohexansäure-dimethylamid, 1,6-Tetramethyldiaminohexan sowie Spermidin zeigten eine gewisse Erhöhung des L-Glukoseeinstroms. Diese Erhöhung jedoch betrug nur etwa 60% der sonst mit 2-Desoxyglukose gemessenen Aktivität.

Substanzen	Erhöhung der Permeation von 2-Desoxyglukose	Erhöhung der Permeation von L-Glukose
Insulin	3-fache	——
Spermidin	2- "	1,6-fache
C_6-Homoagmatin	1,5- "	1,3- "
6-Guanidino-hexansäure-dimethylamid	1,4- "	1,2- "
1,6-Tetramethyldiaminohexan	1,6- "	1,4- "

Tab. 2. Ergebnisse aus dem Glukosepermeations-Test mit L-Glukose.

4) Abhängigkeit vom ATP-Spiegel

Es ist seit langem bekannt, daß eine Beziehung zwischen dem ATP-Spiegel der Zellen und der Insulinwirkung besteht (22). Eine Erniedrigung des ATP-Spiegels hat zur Folge, daß Insulin unter anderem auch seine Wirkung auf die Glukosepermeation vollkommen verliert. Diese Beziehung zwischen ATP-Spiegel und Insulinwirkung wurde hier benutzt, um nochmals die Substanzen, die bei einem normalen Glukosepermeations-Test Aktivität zeigten, auf eine insulinspezifische Wirkung zu prüfen d.h ob ihre Wirkung auch vom ATP-Spiegel abhängig ist.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Glukosepermeations-Test mit L-Glukose zeigte sich auch hier, daß die geprüften Substanzen zum Teil eine insulinspezifische, zum Teil eine insulinunspezifische Aktivität aufweisen. Während auch hier Insulin bei Erniedrigung des ATP-Spiegels seine ganze Aktivität verlor, ging die Aktivität der geprüften Substanzen C_6-Homoagmatin, 6-Guanidino-hexasäure-dimethylamid, 1,6-Tetramethyldiaminohexan sowie Spermidin etwa um 30-40% zurück.

Substanzen	Stimmulierung mit normalem ATP-Spiegel	Stimmulierung mit gesenktem ATP-Spiegel
Insulin	3-fache	—
Spermidin	2- "	1,5-fache
C_6-Homoagmatin	1,5- "	1,3- "
6-Guanidino-hexansäure-dimethylamid	1,4- "	1,2- "
1,6-Tetramethyldiaminohexan	1,6- "	1,4- "

Tab. 3. Ergebnisse aus dem Glukosepermeations-Test in Abhängigkeit vom ATP-Spiegel.
Zur Senkung des ATP-Spiegels wurden die Fettzellen vor der Zugabe von Insulin bzw. der zu prüfenden Substanz 10 min. mit NaN_3 (10 mM) inkubiert.

III. Diskussion

Es hat sich gezeigt, daß Polyamine, insbesondere Spermin und Spermidin, eine Reihe von insulinähnlichen Aktivitäten besitzen. Sie stimulieren die Glukosepermeation und Glukoseoxidation während sie die cAMP-abhängige Lipolyse hemmen (24,25,26).

Über ihren Wirkungsmechanismus ist man bis heute völlig im Unklaren.

Die Annahme, daß man die insulinähnlichen Aktivitäten der Polyamine auf eine direkte Beeinflussung der Zellmembran zurückführen kann, wird durch den Befund unterstützt, daß Spermidin sich an Membranphospholipide binden kann (24).

In neueren Arbeiten (25,26) jedoch wird angenommen, daß die insulinähnlichen Aktivitäten der Polyamine auf die Bildung von H_2O_2 zurückzuführen seien. Unterstützt wird diese Annahme von der Tatsache, daß H_2O_2 insulinähnliche Aktivitäten zeigt. H_2O_2 kann durch oxidative Desaminierung der Polyamine enstehen; eine Reaktion, die durch Amin-Oxidasen katalysiert wird. Eine solche Amin-Oxidase Aktivität ist im Rinderserumalbumin Fraktion V enthalten, die zur Herstellung der Pufferlösungen verwendet wird.

Aus den Ergebnissen der hier untersuchten Substanzen auf die Glukosepermeation mit 2-Desoxy-D-glukose geht deutlich hervor:

1.) Die Guanidinogruppe ist für die Aktivität der

Guanidinoverbindungen ohne besondere Bedeutung, denn sie kann durch andere basische Gruppen (zb.-$N<^{CH_3}_{CH_3}$) ersetzt werden. Das ergibt sich aus der Tatsache, daß die geprüften 1,6-Diaminohexan sowie 1,6-Tetramethyldiaminohexan ebenfalls eine insulinähnliche Aktivität zeigen. Die Tatsache, daß 1,6-Tetramethyldiaminohexan eine Aktivität zeigt, ist von besonderer Bedeutung. Seine Aktivität läßt sich nämlich nicht auf die Bildung von H_2O_2 zurückführen, da hier überhaupt kein H_2O_2 gebildet werden kann.

2.) Für die Wirkung der Substanzen sind dagegen von großer Bedeutung:

a) die Basizität der Substanzen, denn die Aktivität nimmt in der Reihenfolge ω-Guanidino-säure-äthylester < ω-Guanidino-säure-dimethyamide < Homoagmatine < 1,6-Tetramethyldiaminohexan zu.

b) Die Länge der C-Kette bzw. die damit verbundene Lipidlöslichkeit der Substanzen.

Aus der Wirkungsform der Substanzen in Abhängigkeit von der C-Zahl ist zu entnehmen, daß für eine optimale Wirkung ein bestimmtes Verhältnis zwischen Wasser- und Lipidlöslichkeit bestehen muß. Mit anderen Worten: die

C-Kette muß eine bestimmte Länge annehmen. Aus Abb. 8 ist zu ersehen, daß das Optimum bei einer Kettelänge von C_6 - C_8 liegt.

Die Ergebnisse aus dem Glukosepermeations-Test mit 2-Desoxy-D-glukose bekräftigen somit die Annahme, daß die insulinähnlichen Aktivitäten der Polyamine auf eine direkte Beeinflussung der Zellmembran zurückzuführen sind (15).

Die Ergebnisse aus dem Glukosepermeations-Test mit L-Glukose bzw. aus dem Glukosepermeations-Test in Abhängigkeit vom ATP-Spiegel zeigen allerdings, daß die sonst mit 2-Desoxy-D-glukose gemessene insulin-ähnliche Aktivität nur zum Teil spezifisch ist.
Daraus folgt, daß eine Membranänderung, die durch eine unspezifische Bindung der Guanidinoverbindungen an der Zellmembran hervorgerufen wird, für die Wirkung der Substanzen verantwortlich sein muß.

cAMP-TEST

Der für den Gesamtstoffwechsel wichtigste Effekt des Insulins ist wahrscheinlich derjenige auf die Lipolyse. Insulin ist das einzige "antilipolytisch" wirksame Hormon. Es ist somit ein Antagonist von Katecholaminen, STH und Glukagon.

Der Wirkungsmechanismus ist bis heute nicht völlig geklärt. Wahrscheinlich wirkt Insulin letzten Endes über eine Senkung der cAMP-Konzentration, indem es Synthese und Abbau des cAMP beeinflußt (27). Unklar ist hier noch die Rolle von cGMP, dessen Konzentration durch Insulin erhöht wird (28). Insulin hat allerdings keinen Einfluß auf den normalen cAMP-Spiegel. Es bewirkt eine Senkung des durch lipolytische Hormone erhöhten cAMP-Spiegels (29).

cAMP-TEST

I. Methoden

a) Präparation und Inkubation der Fettzellen

Die Fettzellen werden nach derselben Methode präpariert wie für den Glukosepermeations-Test.

Zur Inkubation wird jeweils 1 ml Fettzellsuspension in Teströhrchen pipettiert, in denen schon Adrenalin bzw. Adrenalin und Insulin oder Adrenalin und die zu prüfende Substanz vorgelegt sind. Sowohl Adrenalin, Insulin wie auch die zu prüfende Substanz werden in 10 µl Volumina zugegeben. Die Endkonzentration beträgt für Adrenalin 5,5 µM, für Insulin 0,3 nM und für die Substanzen zwischen 0,1 und 1 mM. Die Inkubationszeit beträgt 5 min. bei 24 °C.

b) Extraktion von cAMP

Die Inkubation wird durch Zugabe von 1 ml einer 10% TCA-Lösung gestoppt. 10-15 min. nach Zugabe der TCA-Lösung werden zuerst durch Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 3200,4 min.) die ausgefallenen Proteine und danach durch Extraktion mit wassergesättigtem Äther die TCA entfernt (6 mal mit 2-3 fachem Volumen). Der Restäther wird durch Erhitzen der Proben auf 80-90 °C für 2-5 min. entfernt. Danach werden die Proben lyophilisiert und schließlich mit 0,3 ml eimer 100 mM KPP-Lösung von pH 7 wiederaufgenommen.

c) cAMP-Bestimmung

Die Bestimmung des cAMP Gehaltes der Proben erfolgte mit der Isotopen-Verdünnungsmethode nach Gilman, A. (30).

Das Prinzip:

Die gereinigte Probe mit unbekanntem Gehalt an cAMP wird zusammen mit definierten Mengen an ^{3}H markiertem cAMP und cAMP-abhängiger Proteinkinase (Binding Protein) inkubiert. Dabei bildet sich ein Protein-cAMP-Komplex. Da ^{3}H markiertes und unmarkiertes cAMP um die Bindung konkurrieren und die Konzentration an ^{3}H-cAMP grösser als die erforderliche Sättigungskonzentration gewählt wird, läßt die Bestimmung des im Protein-cAMP-Komplex enthaltenen ^{3}H-cAMP einen Schluß auf den cAMP-Gehalt der unbekannten Probe zu. Je größer die Radioaktivität des Komplexes ist, desto kleiner war der cAMP-Gehalt der Probe.

Die Isolierung des Protein-cAMP-Komplexes und seine Abtrennung von ungebundenem ^{3}H-cAMP erfolgt durch Absaugen des Inkubationsansatzes durch einen Cellulose-Membranfilter, der den Komplex quantitativ bindet.

Die Standardisierung des Tests geschieht mittels einer Eichkurve.

Der Test:

Es wurde eine Test-Kombination von Boehringer Mannheim benutzt (Adenosin 3:5 monophosphorsäure cyclisch

Radioisotopen-Verdünnungstest , Filtertechnik). Der Test wurde gemäß der Anleitung durchgeführt.

II. Ergebnisse

a) Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester

In Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen (20) erhöhte Adrenalin (5,5 µM) die cAMP-Konzentration in Fettzellen auf den 3-fachen Wert. Bei gleichzeitiger Zugabe von Insulin (0,3 nM) wurde der cAMP-Spiegel bis in die Nähe des Basal-Wertes gesenkt (Basal-Wert: 1,8 pM cAMP/10^5 Zellen). Eine solche Senkung der cAMP-Konzentration war allerdings nur bei einer maximalen Adrenalin Konzentration (5,5 µM) festetellbar.

Die Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester zeigte im cAMP-Test eine relativ hohe insulinähnliche Aktivität.

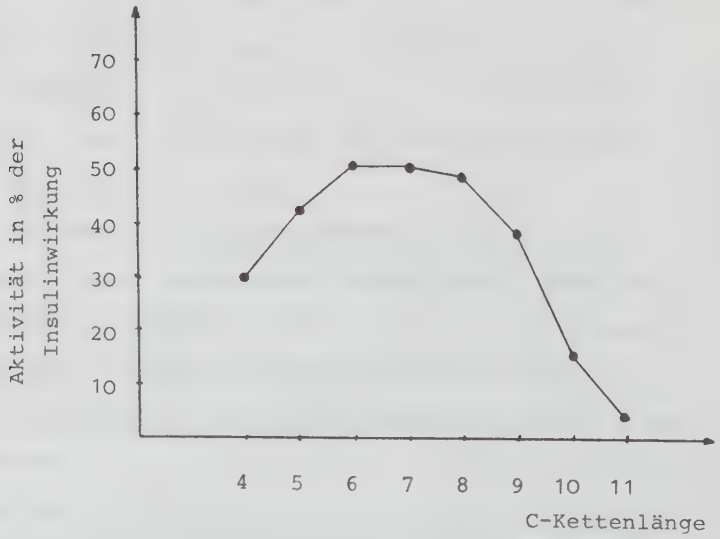


Abb. 9. Ergebnisse aus dem cAMP-Test zur insulinähnlichen Wirkung der ω-Guanidino-säure-äthylester auf den cAMP-Spiegel in Fettzellen

Mit zunehmender C-Kettenlänge nahm die Aktivität zuerst zu, erreichte bei C_6- C_8 ihr Maximum (ca. 50% der Insulinaktivität) und nahm dann ab, bis sich bei 11 - Guanidino-undekansäure-äthylester keine signifikante Aktivität zeigte.

b) Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide

Die Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide zeigte im cAMP-Test ebenfalls eine relativ hohe insulinähnliche Aktivität, wobei die Form der Wirkungskurve in Abhängigkeit von der C-Kettenlänge ähnlich die der Guanidino-säure-äthylester war.

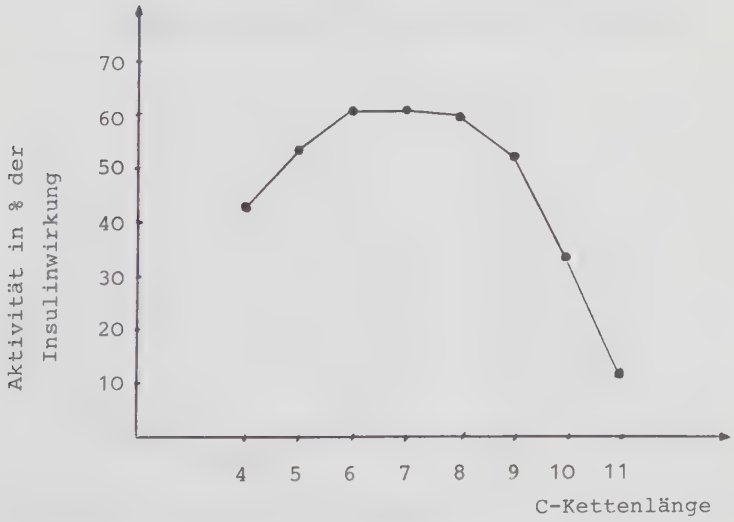


Abb. 10. Ergebnisse aus dem cAMP-Test zur insulinähnlichen Wirkung der ω-Guanidino-säure-dimethylamide auf den cAMP-Spiegel in Fettzellen.

Mit wachsender C-Kettenlänge nahm die Aktivität ebenfalls zuerst zu, erreichte bei C_6- C_8 ihr Maximum (ca. 60% der Insulinwirkung) und nahm dann ab, bis sich bei 11-Guanidino-undekansäure-dimethylamid eine sehr leichte Aktivität zeigte (ca. 10% der Insulinwirkung) . Von den beiden Reihen, die, wie Insulin, eine Senkung des durch Adrenalin erhöhten cAMP-Spiegels bewirkten, zeigte die Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide eine leicht höhere Aktivität.

c) Reihe der Homoagmatine

Bei der Reihe der Homoagmatine zeigte sich, wie man aus Abb. 11 ersehen kann, ein Umkehreffekt.

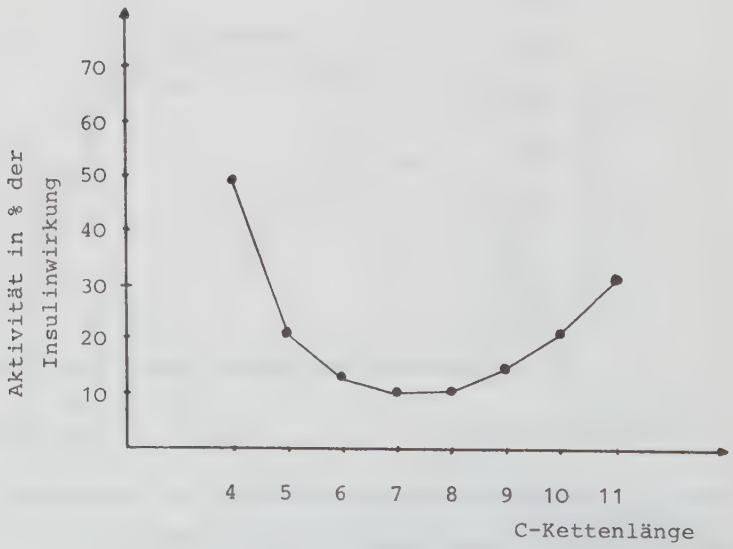


Abb. 11. Ergebnisse aus dem cAMP-Test zur insulinähnlichen Wirkung der Homoagmatine auf den cAMP-Spiegel in Fettzellen.

Mit zunehmender C-Zahl nahm die Aktivität zuerst ab, erreichte bei C_6 - C_8 ein Minimum und begann dann wieder zuzunehmen. Während also C_6-Homoagmatin im Vergleich zu 6-Guanidino-säure-äthylester und 6-Guanidino-säure-dimethylamid eine geringere Aktivität zeigte (ca. 10% der Insulinwirkung) , waren C_4-Homoagmatin sowie C_{11}-Homoagmatin aktiver als die entsprechenden ω-Guanidino-säure-äthylester und ω-Guanidino-säure-dimethylamide.

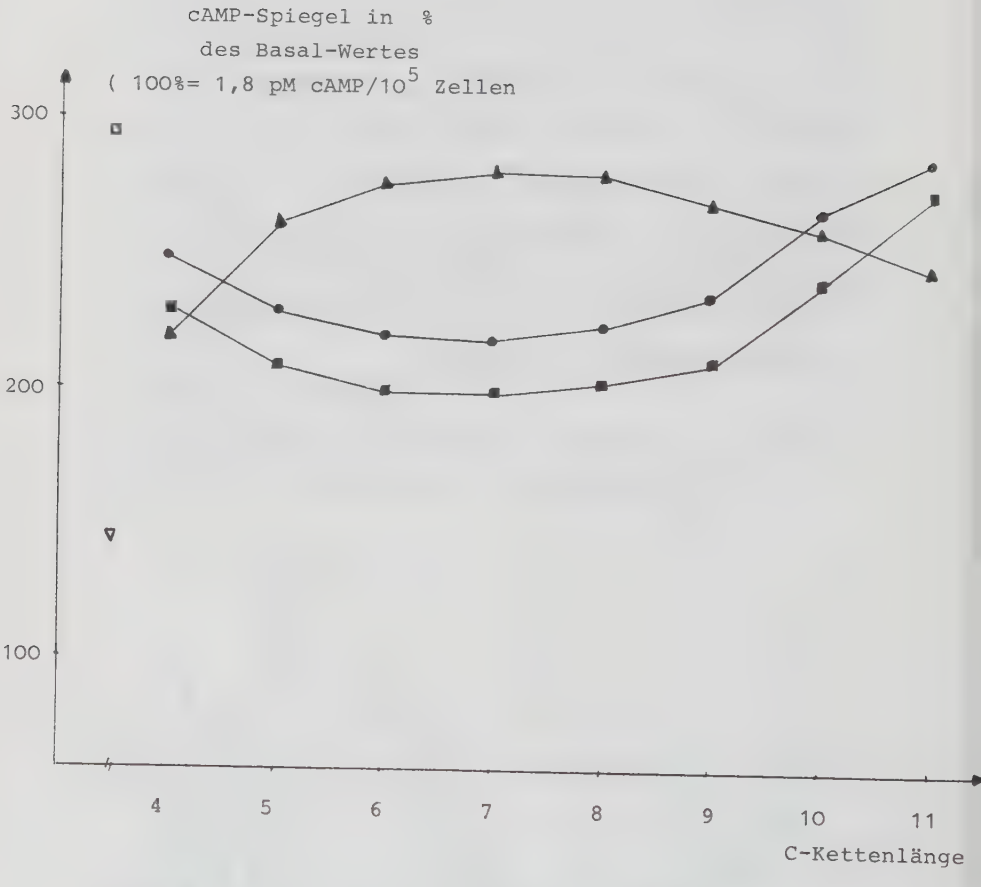


Abb. 12. Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss der drei homologen Reihen auf den cAMP-Spiegel der Fettzellen.

- ▫ : Mit Adrenalin (5,5 µM) erhöhter cAMP-Spiegel
- ▽ : Mit Insulin (0,3 nM) wieder gesenkter cAMP-Spiegel
- ● : Reihe der ω-Guanidino-säure-äthylester
- ■ : Reihe der ω-Guanidino-säure-dimethylamide
- ▲ : Reihe der Homoagmatine

III. Diskussion

Von den Polyaminen, insbesondere Spermin und Spermidin, ist bekannt, daß sie die cAMP-abhängige Lipolyse hemmen (24,25). Die hier untersuchten Guanidinoverbindungen, wie aus dem cAMP-Test deutlich hervorgeht, zeigen ebenfalls einen Effekt auf den cAMP-Spiegel.

Die Interpretation der Ergebnisse wird jedoch durch die Tatsache erschwert, daß die cAMP-Konzenztration von mehreren insulinabhängigen Faktoren (zb. Adenylat-Zyklase cAMP-Phosphodiesterase, Guanylat-Zyklase) bestimmt wird. Trotzdem geht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Glukosepermeations-Tests deutlich hervor, daß auch hier für die gezeigte Aktivität der Guanidinoverbindungen nicht die Guanidinogruppe selbst, sondern die Basizität und Lipidlöslichkeit der Verbindungen eine endscheidende Rolle spielen.

Die Ergebnisse des cAMP-Tests bekräftigen somit nochmals die Annahme, daß die insulinähnlichen Aktivitäten der Polyamine auf eine direkte Beeinflüssung der Zellmembran zurückzuführen sind.

ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DER GUANIDINOVERBINDUNGEN

Wie aus den Ergebnissen dieser Arbeit deutlich hervorgeht, kommt den Guanidinoverbindungen eine Vielzahl von wichtigen biologischen Effekten zu. Es hat sich gezeigt, daß sie die Glukosepermeation und den cAMP-Spiegel in den Fettzellen beeinflussen können. Aus den Ergebnissen kommt auch deutlich hervor, daß nicht alle Effekte der Guanidinoverbindungen mit Hilfe eines einzigen Wirkungsmechanismus erklärt werden können. Bei der hemmenden Wirkung der Guanidinoverbindungen auf die mitochondriale Atmung deuten sie auf eine spezifische Wirkung der Substanzen hin und bekräftigen somit die Hypothese von Papa, S. , Tuena de Gomez-Puyou, M. und Gomez-Puyou, A. (11), daß Guanidin und Guanidinderivate eine spezifische Bindung mit dem ATPase-Komplex eingehen und daß diese Bindung für ihren inhibitorischen Effekt auf die mitochondriale Atmung verantwortlich sein muß. Für die Wirkung der Guanidinoverbindungen auf die Glukosepermeation und den cAMP-Spiegel in Fettzellen läßt sich hingegen annehmen, daß eine Membranänderung, die durch eine unspezifische Bindung der Substanzen an die Zellmembran der Fettzellen hervorgerufen wird, verantwortlich sein muß. Diese Annahme wird noch durch die Ergebnisse aus Insulinrezeptor-Bindungs-Tests, die von Eichler, W. durchgeführt worden sind, besonderns unterstützt (38). Es wurde festgestellt:

a) Guanidinoverbindungen, wie auch Polyamine (z.B. Spermidin) sind nicht in der Lage, Insulin vom Rezeptor zu verdrängen. Eine Bindung der Guanidinoverbindungen sowie der Polyamine (Spermidin) am Insulinrezeptor ist somit mit Sicherheit auszuschließen.

b) Manche der Guanidinoverbindungen (z.B. C_6-Homoagmatin) können durch unspezifische Bindung an der Zellmembran der Fettzellen starke Membranänderungen hervorrufen. Dabei spielt die Basizität und die Lipidlöslichkeit der Substanzen eine wichtige Rolle.

Somit läßt sich für den Wirkungsmechanismus der Guanidinoverbindungen auf die Glukosepermeation und den cAMP-Spiegel in Fettzellen folgendes Bild annehmen:

a) Es kommt zuerst zu einer unspezifischen Membranbindung.

   Dafür sprechen folgende Tatsachen:

   1) Die Guanidinogruppe ist nicht zwingend notwendig (Sie kann durch andere basische Gruppen z.B. $-N<^{CH_3}_{CH_3}$ ersetzt werden)

   2) Die Wirkung der Substanzen ist in erster Linie von der Basizität und der Lipidlöslichkeit abhängig.

   3) Die Substanzen gehen keine spezifische Bindung mit dem Insulinrezeptor ein.

b) Durch die Membranbindung wird entsprechend der Bindungsstärke eine Membranänderung hervorgerufen.

   Dies folgt aus:

   1) Eine Erhöhung der Glukosepermeation erfolgte auch

mit L-Glukose, obwohl der Einstrom von L-Glukose in die Zellen durch einfache Diffusion erfolgt (23). Somit ist die Wirkung der Substanzen nicht streng spezifisch.

2) Die Wirkung der Substanzen zeigte sich auch entgegen der Insulinwirkung bei gesenktem ATP-Spiegel

c) Aller Wahrscheinlichkeit nach führt jetzt diese Membranänderung zu den spezifischen Effekten.

Jedoch ist, allerdings mit geringer Wahrscheinlichkeit, eine direkte Beeinflußung der Glukosepermeation bzw. des cAMP-Systems durch die Guanidinoverbindungen nicht auszuschließen.

Hier sei allerdings zu betonen, daß alle hier diskutierten Resultate immer nur für das entsprechende System (z.B. Fettzellen, Lebermitochondrien) Gültigkeit haben können, d.h. daß sie in anderen Kompartimenten nicht unbedingt Gültigkeit besitzen müssen. Das heisst aber auch andererseits, daß einzelne Effekte, die zunächst schwer miteinander in Einklang zu bringen sind, nicht unbedingt einer gemeinsamen Grundlage entbehren müssen.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Klärung des Wirkungsmechanismus von Guanidinoverbindungen wurde die Wirkung 3 homologer Reihen (der ω-Guanidino-säure-äthylester, der ω-Guanidino-säure-dimethylamide sowie der Homoagmatine $\overset{HN}{H_2N}\!\!>\!C\!-\!NH\!-\!(CH_2)_n\!-\!NH_2$) auf die Atmung von Lebermitochondrien sowie die Glukosepermeation und den cAMP-Spiegel von Adipocyten untersucht.

Aus den Ergebnissen kommt deutlich hervor, daß die Guanidinoverbindungen nicht nur die Atmung von Lebermitochondrien, sondern auch die Glukosepermeation und den cAMP-Spiegel von Adipocyten beeinflussen können. Die Ergebnisse für die hemmende Wirkung der Guanidinoverbindungen auf die mitochondriale Atmung deuten auf eine spezifische Bindung der Substanzen mit dem ATPase-Komplex hin. Die Wirkungen der Guanidinoverbindungen auf die Glukosepermeation und den cAMP-Spiegel in Fettzellen lassen jedoch annehmen, daß Membranänderungen, die durch eine unspezifische Bindung der Substanzen an der Zellmembran der Fettzellen hervorgerufen werden, verantwortlich sein müssen.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Watanabe, C. K. : J. Biol. Chem. 33 253 (1918)

2) Hollunger, G. : Acta Pharmacol. Toxicol. 11 Suppl. 1 (1955)

3) Donald E. Steiner and Robert H. Williams : Biochim. et Biophys. Acta 30 329 (1958)

4) Weitzel, G., Stock, W. und Guglielmi, H. : Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353 1661 (1972)

5) Takaschi Matsubara, Yoschihiro Tochino : J. Biochem. 66 397 (1969)

6) Pressman B. C. : J. Biol. Chem. 238 401 (1963)

7) Chappel J. B. : J. Biol. Chem. 238 410 (1963)

8) Schäfer, G. : Biochim. et Biophys. Acta 93 279 (1961)

9) Schäfer, G. : Eur. J. Biochem. 45 57 (1964)

10) Schäfer, G., Rieges, E. : Eur. J. Biochem. 46 613 (1974)

11) Papa S., Tuena de Gomez-Puyou M., Gomez-Poyou A. : Eur. J. Biochem. 55 1 (1975)

12) Di Girolamo, M. , Rudman, D. : Endocrinology 82 1133 (1968)

13) Salans, L. B., Doughety, J. W. : J. Clin. Invest. 50 1399 (1971)

14) Elbrink, J., Bihler, I. : Science 188 1177 (1975)

15) Clausen, T. : Curr. Top. Membrane Transp. 6 169 (1975)

16) Rodbell, M. : J. Biol. Chem. 239 375 (1975)

17) Gliemann, J., Osterlind, K., Vinter, J. and Gammeltoft, S. : Biochim. et Biophys. Acta 286 1 (1972)

18) Wick, A.N., Drury, D.R., Nakada, H.I. and Wolfe, J.B.: J. Biol. Chem. 224, 936 (1957)

19) Glieman, J.and Whitesell, R. : Diabetologia 13, 396 (1977)

20) Olefsky, J.M. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 106 (1976)

21) Visvanathan, C., Marianne, M.and James R.C. : Biochemistry 16, 1151 (1977)

22) Kono, T., Roninson, F., Sarver J., Vega, F., and Pointer, R. : J. Biol. Chem. 252, 2226 (1977)

23) Ciaraldi, T. and Olefsky, J. : Archives of Bioch. and Biophys. 193, 221 (1979)

24) Lockwood, D. and East, E. : J. Biol. Chem. 249, 7717 (1974)

25) Livingston, J., Gurny, P. and Lockwood, D. : J. Biol. Chem. 252, 560 (1977)

26) May, J. and De Haen, C. : J. Biol. Chem. 254, 2214 (1979)

27) Lambert, B. and Jacquelin, C. : FEBS-Letters 105, 19 (1979)

28) Illiano, G., Tell, G., Siegel, M. and Cuatrecasas, P. : Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2443 (1973)

29) Sidle, K. and Hales, N. : Biochem. J. 142, 97 (1973)

30) Gilman, A. : Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 305 (1970)

31) Gammeltoft, S., Glieman, J., Hjersen, G. and Johnansen, T. : Biochem. Biophys. Acta 320, 16 (1973)

32) Cuatrecasas, P. : Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 450 (1969)

33) Cuatrecasas, P. : Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1264 (1971)

34) Cuatrecasas, P. : Fed. Proc. 32, 1838 (1973)

35) Glieman, J., Gammeltoft, S. and Vinter, J. : J. Biol. Chem. 250, 3368 (1975)

36) Jacobs, S. and Cuatrecasas, P. : Biochem. Biophys. Acta 433, 482 (1975)

37) Maturo, J. and Hollenberg, M. : Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 3070 (1978)

38) Persönliche Mitteilung W. Eichler

39) Hogeboom, G., Schneider, G. H., Palade, G. E. : J. Biol. Chem. 172, 619 (1948)

40) Hagihara, B. : Biochim. et Biophys. Acta 93, 134 (1961)

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Biochemie: G. Weitzel, H. Guglielmi, U. Weser, U. Weber

Organische Chemie: E. Müller, E. Bayer

Anorganische Chemie: W. Rüdorff

Physikalische Chemie: G. Kortüm, H. Mauser

Mikrobiologie: H. Zähner

Physiologie: E. Betz

Pharmakologie: H. Remmer

Physik: H. Krüger

Anatomie: K. Mörike

LEBENSLAUF

Ich bin am 4.9.44 in Athen / Griechenland geboren. Die Volksschule und das Gymnasium besuchte ich in Thessaloniki / Griechenland von 1951-1962.

Anschliessend begann ich im WS 1962/63 in Tübingen mit dem Studium der Medizin. Im SS 1964 wechselte ich zur Biochemie. Ende des WS 1964/65 unterbrach ich das Biochemiestudium, um meinen Militärdienst abzuleisten. Danach setzte ich im WS 1967/68 in Tübingen das Biochemiestudium fort. Den 1. Teil des Vordiploms legte ich im Sept. 1968 und den 2. Teil im Okt. 1972 ab. Die Diplomhauptprüfung folgte im Feb. 1977. Von April 1977 bis Okt. 1977 arbeitete ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel an meiner Diplomarbeit mit dem Thema: Einfluss von Insulin und einer Reihe von Amino- und Guanidinoverbindungen auf den Glukosetransport in isolierten Fettzellen.

Von Dezember 1977 bis Juni 1980 arbeitete ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel im selben Institut an der vorliegenden Dissertation.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Forststraße 58 Telefon 0711/610641-42
7000 Stuttgart 1

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Forststraße 58 Telefon 0711/610641-42
7000 Stuttgart 1